Experimentelle Studie über den Einfluß von Pentoxyl auf das periphere Blutbild nach Gabe von myelotoxischem Azathioprin (Imuran R)

Uwe Helms

1972

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546015_0097

Aus der Chirurgischen Klinik der
Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. R. Zenker

EXPERIMENTELLE STUDIE ÜBER DEN EINFLUSS VON PENTOXYL AUF DAS PERIPHERE BLUTBILD NACH GABE VON MYELOTOXISCHEM AZATHIOPRIN (IMURAN ^{R})

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin verfaßt
und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilian-Universität zu München

vorgelegt von
Uwe Helms
aus
Berlin

München 1972

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. H. Pichlmayr

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. R. Zenker

Dekan: Prof. Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 1o. Oktober 1972

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

DISSERTATIONS – und FOTODRUCK FRANK oHG
8000 München 2 · Gabelsbergerstr. 15 · Tel.: 2 80 90 90

Inhalt: Seite:

E i n l e i t u n g 1

Material und Methodik 2

I. Substanzen 2

1. Pentoxyl 2

2. Azathioprin 5

II. Tiermaterial 8

III. Versuchsanordnung 8

1. Ort der Blutgewinnung 9

2. Applikationsform der Pharmaka 1o

IV. Gliederung der Versuchsserien 11

V. Statistische Auswertung der Versuchsergebnisse 12

E r g e b n i s s e 13

I. Erster Versuchsabschnitt 13

II. Zweiter Versuchsabschnitt 14

1. Mortalität der Tiere 14

2. Widerstandsfähigkeit der Tiere 16

3. Pathophysiologie und Pathohistologie 17

4. Das Verhalten der Leukozytenwerte 19

D i s k u s s i o n 28

I. Diskussion unserer Ergebnisse mit den Ergebnissen in der Literatur 28

II. Argumente für das atypische Verhalten der peripheren Leukozyten 3o

1. Gestörte Resorption durch gastrointestinale Erkrankung 3o
2. Bildung eines Alternativstoffwechsels 31
3. Frühzeitige Mortalität der Versuchstiere 32
4. Das Verhalten der Leukozytenwerte in Serie 5 und 6 33

Zusammenfassung 35

Literatur 37

Anhang (Tabellen) 43

E i n l e i t u n g

Seit 1966 werden an der Chirurgischen Universitätsklinik München Nierentransplantationen an Menschen ausgeführt (4). Diese Patienten erhalten postoperativ Azathioprin, Corticoide und Antilymphocytenserum. Unter dieser Therapie entwickelte sich mehrfach als Folge der myelotoxischen Wirkung des Azathioprin eine Leukopenie (47), deren Übergang in eine irreversible Panmyelophthise in der Literatur bereits beschrieben worden ist (14, 24, 33, 4o).

Bedenkt man einerseits die heute umfangreiche Anwendung des Azathioprin sowohl in der Transplantationschirurgie als auch bei vielen Immunopathien und andererseits den u.U. irreversiblen Charakter der durch Azathioprin induzierten, toxischen Myelophthisen, so wird verständlich, mit welchem Interesse eine Substanz betrachtet wurde, die sowohl auf die Hämatopoese als auch auf die Leukopoese eine stimulierende Wirkung ausüben sollte. Dem Pentoxyl wird nach Angaben in der russischen Literatur eine derartige Wirkung zugeschrieben (5, 13, 25, 26, 34). Nach ausführlicher experimenteller Erprobung wird dieses Präparat seit 1950 (5) in Rußland klinisch angewandt (1, 5, 12, 24, 25, 28).

In der vorliegenden Arbeit wollten wir durch tierexperimentelle Studien die Wirkung dieser Substanz untersuchen und gleichzeitig prüfen, ob sie eine durch Azathioprin induzierte myelotoxische Wirkung zu cupieren vermag.

Als Versuchstier sollte die Ratte dienen, die sich nach Angaben in der Literatur (21) und nach eigenen Vorversuchen als geeignet erwiesen hatte. Der Grad der Knochenmarksdepression sollte anhand des peripheren Blutbildes beurteilt werden.

Material und Methodik:

I. Substanzen

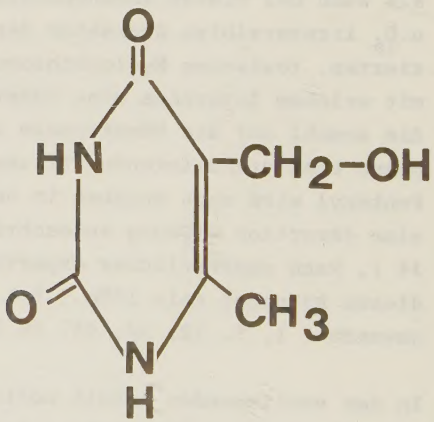
1. Pentoxyl:

Als leukopoesestimulierende Substanz wurde ein Derivat aus der Pyrimidingruppe, das Pentoxyl, verwandt, welches uns von der Firma Byk-Gulden, Konstanz, zur Verfügung gestellt wurde.

Chem. Bezeichnung: 5-oxymethyl-4-methyl-uracil

Summenformel : $C_6H_8N_2O_3$

Strukturformel :



Molekulargewicht	:	156,14
Beschreibung	:	weiße, geruchlose, feinkristalline Substanz
Schmelzpunkt	:	ab 280°C Zersetzung
Feuchtigkeit	:	nicht über 0,5 %
Asche	:	nicht über 0,2 %

Stickstoff : 17,75 - 17,94 %
Löslichkeit : schwer löslich in Alkohol und Äther; wenig löslich in Wasser

Reinheit : mind. 98 %

Das Pentoxyl wird in der russischen Literatur als allgemeiner Stimulator der Organfunktionen beschrieben, fördert die Gewebsregeneration, beschleunigt die Wundheilung und hat bedeutende entzündungshemmende Eigenschaften (8). Insbesondere stimuliert es die Hämatopoese, Leukopoese und - wenn auch in geringerem Maße - die Thrombopoese (5, 13, 25). Dieser Stimulationseffekt kann durch Anwendung anderer, ebenfalls die Leukopoese fördernder Medikamente noch verstärkt werden. In experimentellen, wie auch in klinischen Studien waren mit dieser Substanz besonders günstige Ergebnisse bei toxischen Leukopenien und Agranulocytosen erzielt worden (1, 5). Nach MINKINA (34) ist dabei der Erfolg durch das Pentoxyl völlig unbestreitbar. In diesem Sinn äußert sich auch die überwiegende Mehrzahl der Autoren, die im russischen Sprachgebiet mit dieser Substanz gearbeitet haben (25, 26). Nur LISOVECKAJA (3o) und WASSILJEV und SSAKSSONOW (45) haben die durch Pentoxyl erzielten Erfolge bezweifelt.

Dosierung:

Pentoxyl erwies sich bei oraler, wie auch parenteraler Applikation gleich wirksam (5). Nach den Richtlinien des sowjetischen Gesundheitsministerium ist oral wie folgt zu dosieren:

Erwachsene	2oo - 4oo mg
maximale Tagesdosis	1.2oo mg
Tiere (Ratten)	1o - 15 mg/kg (33)

Toxizität:

Bei der Prüfung der Toxizität wurden keine ungünstigen Wirkungen auf das cardiovaskuläre und respiratorische System bei Warmblütern gefunden. Bei der toxikologischen Prüfung an Mäusen wurden 1o g/kg, also das fast tausendfache der therapeutischen Dosis, reaktionslos vertragen.

Die stimulierende Wirkung setzt rasch - innerhalb der ersten beiden Tage - ein und hält bis zum Entzug der Substanz an. Eine sich u.U. entwickelnde Hyperleukozytose infolge excessiver Stimulierung klingt nach Absetzen der Therapie bald ab. (5)

Kontraindikation:

Über die Kontraindikation gegen das Pentoxyl finden sich in der Literatur nur wenige Angaben. Als solche werden beschrieben:

Lymphogranulomatose,

pathologische Aktivitätssteigerungen des Knochenmarks (myeloische Leukämien etc).

Von Dosis und Behandlungsdauer unabhängige Nebenerscheinungen wie Übelkeit, Sodbrennen und Schwindelgefühl haben nur DOMSHLAK und KOZNOVA (13) gesehen. Alle übrigen Autoren der zur Verfügung stehenden Literatur betonen dagegen die gute Verträglichkeit des Präparates.

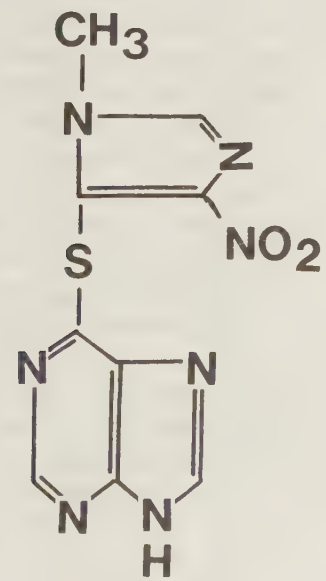
2. Azathioprin:

Das Azathioprin ist als Imidazolderivat eine Weiterentwicklung des 6-Mercaptopurin, welches 1960 von SCHWARTZ und DAMESHEK (42) in die immunosuppressive Therapie eingeführt ist. Da letzteres eine sehr kleine therapeutische Breite besaß, suchte man nach Derivaten mit größerer Effektivität und fand es im Imidazolderivat, dem Azathioprin. Dieses wurde im Dezember 1966 erstmals als Immunsuppressor im Brit. Med. Journal vorgestellt durch die Burroughs Wellcome and Co Ltd.

Chemische Bezeichnung: 6-(methyl-4-nitroimidazol-5-ylthio)purin

Summenformel : $C_8H_6N_7O_2S$

Strukturformel :



Azathioprin ist leicht durch Sulfhydrilgruppen, durch Glutathion oder durch starke Alkali in 6-Mercaptopurin spaltbar; eine Transformation, die sich auch in vivo am Wirkort vollzieht, wenn auch damit nicht alle Wirkungen des Azathioprin erklärt werden können (10, 19, 33). Die Wirkung dieser Substanz tritt nach zwei bis vier Tagen ein und hält mindestens bis zum Absetzen der Therapie an. Azathioprin greift in die Nucleinsäuresynthese hemmend ein und verhindert die Bildung der Adenylsäure. Nur einen geringen Effekt übt es auf den Metabolismus des Guanin und Xanthin aus (11).

Abbildung 1 soll mögliche Angriffspunkte des Azathioprin, seine Rolle in der Immunsuppression und die metabolischen Abbauprodukte skizzieren.

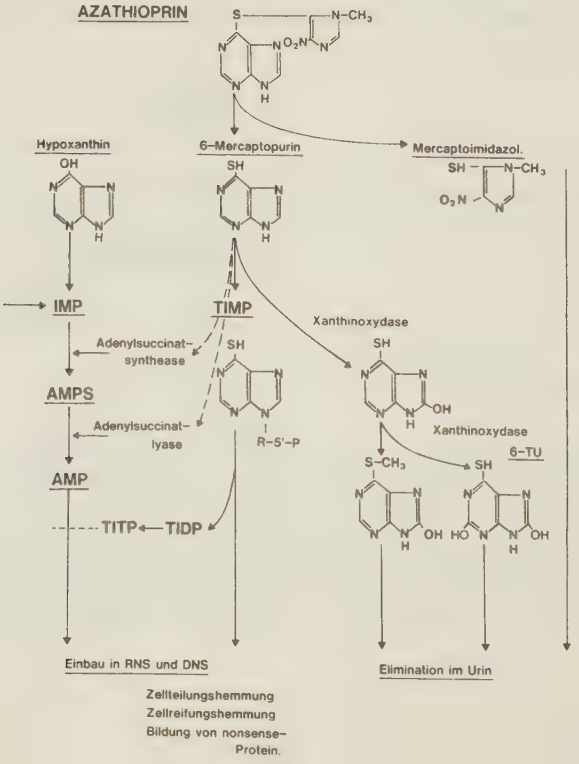


Abb. 1: Abbau - und Angriffspunkte des Azathioprin:
———— Abbauwege
-------- inhibitorische Wirkorte
(AMPS = Adenylsuccinat; AMP = Adenylmonophosphat; IMP = Inosinmonosphat; TIMP = Thioinosinmonosphat; TIDP = Thioinosindiphosphat; TITP = Thioinosintriphosphat).

Dosierung:

Erwachsenen	(per os)	2-4	mg/kg und die
Tiere: Ratten	(per os)	4oo	mg/kg
	LD_{5o} (intraperitoneal)	31o	mg/kg
	Mäuse	25-15o	mg/kg

Da das Medikament an mehreren Stellen im Purinstoffwechsel angreift und vor allem die Zellproliferation hemmt, werden besonders Organe oder Gewebe mit rascher Zellregeneration geschädigt, wie Knochenmark, Gonaden, Darmepithelien und das RES. Andere Nebenwirkungen wie anorexia, nausea und vomitus scheinen weniger bedrohlich zu sein. Bei excessiv hoher Dosierung wurden Leberschädigungen und Muskeldystrophien beschrieben, so daß Leberschäden und eingeschränkte Nieren. funktion als relative Kontraindikation gelten.

Über die Hälfte der Droge wird mit Urin innerhalb von 24 Stunden ausgeschieden, sowohl unverändert als auch Metabolite, wobei die 6-thiouric-acid den Hauptanteil ausmacht (17).

II. Tiermaterial

Als Versuchstiere wählten wir die Ratte, wobei wir im ersten Versuchsabschnitt einen Ratten-Hausstamm aus der Münchener Universitätsklinik unbekannten Alters, unbekannten Geschlechts und mit einem mittleren Gewicht von 25o g benutzten.

Da die Leukozytenschwankungen beim einzelnen Tier während des ersten Versuchsabschnitts erheblich waren, kam Zweifel auf, ob das verwandte Tiermaterial einerseits vom Stamm, andererseits von der Gattung her für derartige Untersuchungen geeignet War. Wir holten daher vom Zentralinstitut für Versuchstierzucht in Hannover (Dr. Dr. Spiegel)und der Veterinärmedizinischen Klinik München (Prof. Kraft) Informationen mit dem Ergebnis ein, daß die Ratte trotz der erheblich individuellen Leukozytenschwankungen das geeignetste Tier für diese Versuche sei, wenn man nicht auf das Hausschwein ausweichen wollte.

Daher wurden im zweiten Versuchsabschnitt, dem Hauptversuch, 2oo weibliche SPF-Wistarratten aus einer Nachzucht eines in England gezogenen Stammes (Allington Farm, Porton Down) verwandt. Weibliche Tiere im Alter von 12 - 2o Wochen und einem mittleren Gewicht von 2oo g hatten sich nach Vorversuchen am Zentralinstitut für Versuchstierzucht in Hannover als relativ günstig erwiesen.

III. Versuchsanordnung

Der Versuch gliederte sich in zwei Abschnitte, wobei der erste in Serie 1 und 2, der zweite in Serien von 1 bis 6 unterteilt wurde (s. Tab. I).

Der Versuchsablauf war mit Ausnahme der Serie 5 in allen Serien beider Abschnitte gleichartig.

1. Ort der Blutgewinnung:

Zu Beginn der Versuche erhob sich die Frage, wie und an welchem Ort die Blutentnahme vorzunehmen sei, wobei die retroorbitale, femorale Entnahme oder die Blutgewinnung durch Abschneiden der Schwanzspitze zur Diskussion stand. Nach Angaben in der Literatur (KLIENEBERGER zit. H. SCHEUFLER) (41) besteht bei der Ratte kein erheblicher Unterschied in den Leukozytenzahlen zwischen Femoralarterien- und Schwanzvenenblut. Auf die Blutentnahme aus dem retroorbitalen Venenplexus (nach B.N. HALOERN et.al.), die von H.G. NÖLLER besonders empfohlen wird, haben wir verzichtet, da sich nach unseren Vorversuchen kein wesentlicher Unterschied zwischen den Ergebnissen dieser Punktion und der Schwanzvenenpunktion ergeben hatte.

Somit erfolgte die Blutentnahme zur Bestimmung der peripheren Leukozyten, die uns als Kriterium für die Wirksamkeit der verwandten Substanzen galten, durch die Punktion der Schwanzvene, nachdem dieser 2 bis 3 Minuten in 3o - 4o°C heißem Wasser hyperämisiert war. Dadurch konnten wir in den meisten Fällen Streichen, Drücken und Massieren des Schwanzes und dadurch bedingte Fehlerquellen infolge Beimengung von Gewebsflüssigkeit vermeiden.

Zur Abschneidung der Schwanzspitze konnten wir uns nicht entschließen, da wir dadurch eine latente oder manifeste Infektion mit ihren Aus-

wirkungen auf die Myelopoese befürchteten.

Die Blutentnahme erfolgte immer zur gleichen Zeit, um den Einfluß des Tagesrhythmus auf die Leukozytenzahl auszuschließen (2o).

Das bei der Schwanzvenenpunktion austretende Blut wurde mit der Leukozytenpipette - nach vorherigem Abtupfen des ersten Tropfen - und nachfolgend mit Türkscher Lösung aufgezogen. Anschließend erfolgte die Auszählung in üblicher Weise mit einer Zählkammer nach Zeiss-Thoma (4).

Die Leukozyten wurden alle zwei Tage bestimmt, zunächst dreimal vor der ersten Medikation, um einen mittleren Ausgangswert zu erhalten, dann wurden im Anschluß an die dritte Leukozytenbestimmung die Substanzen erstmals appliziert und fortan nach jeder weiteren zweitägigen Blutentnahme; insgesamt also maximal zehnmal.

2. Applikationsform der Pharmaka:

Die Medikamente wurden in Form einer Suspension appliziert, wobei die je nach Serie festgelegte Azathioprin- bzw. Pentoxyl-Menge, die zuvor mittels einer Präzisionswaage (Firma Mettler) bestimmt und dann homogenisiert wurde, in ca. 3 ml aqua dest. suspendiert wurde. Diese Suspension wurde jedesmal erst kurz vor der Applikation hergestellt und dann über eine Magensonde verabreicht. Die Sondierung erfolgte mit Hilfe einer ca. 1o cm langen Kanüle, die an der Spitze eine Olive trug und die an der Grenze vom peripheren zum mittleren Drittel in einem Winkel

von 25 Grad gebogen war. Bei dieser Applikationsart konnten wir auf eine Narkose verzichten und somit deren Einfluß auf das periphere Blutbild verhindern (2o). Außerdem schalteten wir die durch die Narkose bedingten Gefahren aus, die in einer Blutverteilungsstörung und möglichen Aspirationspneumonien lagen.

Zwei Tage nach der letzten Medikation wurden die Leukozyten abschließend gezählt, so daß sich ein durchschnittlicher Beobachtungszeitraum von 3 Wochen für jede Serie ergab.

IV. Gliederung der Versuchsserien

Abschnitt I. (Rattenhausstamm)

1. Serie:	5o mg Azathioprin komb. mit 1o mg Pentoxyl	1o Tiere
2, Serie:	5o mg Azathioprin	1o Tiere

Abschnitt II (SPF-Wistar-Ratten)

1. Serie:	7o mg Azathioprin komb. mit 2o mg Pentoxyl	5o Tiere
2. Serie:	7o mg Azathioprin	5o Tiere
3. Serie:	5o mg Azathioprin komb. mit 2o mg Pentoxyl	25 Tiere
4. Serie:	5o mg Azathioprin	25 Tiere
5. Serie:	3o mg Azathioprin komb. mit 2o mg Pentoxyl	25 Tiere
6. Serie:	3o mg Azathioprin	25 Tiere

Alle Serien wurden, wie es im Text beschrieben ist, behandelt. Nur in der Serie 5 des zweiten Versuchs-

abschnittes wurden - im Gegensatz zu allen anderen Serien - vor Beginn der kombinierten Azathioprin-Pentoxyl-Therapie dreimal hintereinander jeden zweiten Tag 2o mg Pentoxyl allein appliziert, um zu prüfen, ob Pentoxyl allein an gesunden Tieren dieses Stammes einen leukopoetischen Effekt entfaltet.

Während der Versuchszeit starben in den einzelnen Serien unterschiedlich viele Tiere, deren prämortale Werte in den Ergebnissen mitberücksichtigt wurden.

Stichprobenartige Sektionen und pathohistologische Untersuchungen der Leber und Lunge dieser Tiere wurden vorgenommen.

V. Statistische Auswertung der Versuchsergebnisse

Die Berechnung der Standardabweichungen und Signifikanzen erfolgte nach den für Arbeiten an biologischem Material vereinfachten Gauss-Laplace'schen Formeln:

Standardabweichung des Mittelwertes:

$$s_M = \pm \frac{\sqrt{\frac{x^2}{n-1}}}{\sqrt{n}}$$

wobei: x = Abweichung des Einzelwertes vom Mittelwert

n = Zahl der Einzelwerte pro Versuchsreihe

Standardabweichung von D:

$$s_D = \pm \sqrt{s_{M_1}^2 + s_{M_2}^2}$$

(D = Differenz der Mittelwerte M_1 und M_2 der beiden zu vergleichenden Versuchsreihen).

Daraus erfolgt die Berechnung der Abweichung t :

$$t = \pm D/s_D$$

und der Zahl der Freiheitsgrade m :

$$m = n_1 + n_2 - 2$$

Der für die Beurteilung der Signifikanz wichtige Probabilitaswert p kann für die jeweils berechneten Werte von t und m einer t-Verteilungstabelle (12) entnommen werden. Nach den in der Biologie üblichen Kriterien wurde auch in dieser Arbeit ein p von o,o5 als ger-ade noch ausreichend für das Vorliegen signifikanter Unterschiede angesehen.

In den Fällen, in denen sich signifikante Unterschiede nicht gezeigt haben, wurde auf die Wiedergabe der Berechnungen verzichtet.

E r g e b n i s s e :

I. Erster Versuchsabschnitt

Die Vorversuche des Abschnitts I dienten hauptsächlich der Erlernung der Sondenapplikationstechnik, der Schwanzvenenpunktion und zur Klärung der Fragen,

welcher Punktionsart und ob die Spezies-Ratte für derartige Versuche geeignet war. Außerdem wurde hier getestet, welche Dosierungen der einzelnen Substanzen notwendig waren. Da im Abschnitt I anhand der Leukozytenwerte kein Anhalt für eine Pentoxyl-Wirkung erbracht werden konnte, wurde die Pentoxyldosis im Abschnitt II auf 2o mg pro Tier und Applikation verdoppelt. Da alle anderen Werte aus diesem Vorversuch keine charakteristischen Aussagen erlaubten, bleiben sie bei der Besprechung der Ergebnisse unberücksichtigt.

II. Zweiter Versuchsabschnitt

Im zweiten Versuchsabschnitt wurde eine verbesserte Versuchsanordnung gewählt. Es wurden nur weibliche SPF-Wistar-Ratten im Alter zwischen drei und fünf Monaten und einem mittleren Gewicht von 2oo g verwandt.

1. Mortalität der Tiere:

In den Serien 1 - 6 zeigt die Sterbefolge der Tiere eine recht exakte Übereinstimmung mit dem exponentiellen Gesetz. In Abb. 2 ist die Überlebensrate L dargestellt über die Applikationsfolge (t) für alle Serien des zweiten Versuchsabschnitts. Zu jeder der drei Sterbefolgelinien (3o, 5o, 7o mg Azathioprin) sind über den Applikationen jeweils zwei Symbole eingetragen (mit Ausnahme der 9. und 1o. Applikation der 1. und 2. Serie), die die Azathioprin-behandelten Tiere einerseits mit und andererseits ohne Pentoxyl charakterisieren.

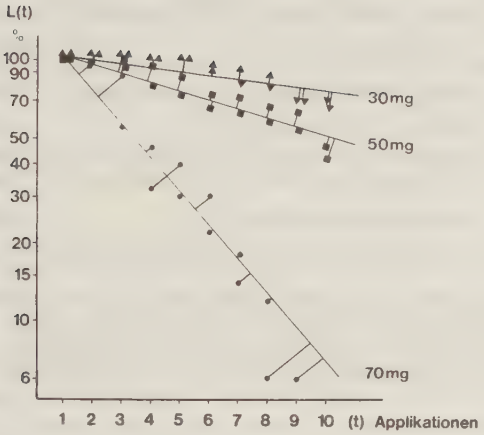


Abb. 2: Überlebensrate $L_{(t)}$ aller Tiere des zweiten Versuchsabschnitts graphisch dargestellt mit logarithmischer Ordinate.

Wie aus der Abb. 2 ersichtlich ist, beeinflußt die Gabe von 2o mg Pentoxyl in Kombination mit Azathioprin die Sterberate nicht. Die durchschnittliche Lebensdauer der Tiere erwies sich als eindeutig abhängig von der Höhe der Azathioprin-Dosierung. Tabelle 2 soll das noch einmal verdeutlichen.

Serie	Applikationsdosis	Applikationen 1.	9.
1	7o mg Azathioprin + 2o mg Pent.	1oo %	O %
2	7o mg Azathioprin	1oo %	6 %
3	5o mg Azathioprin + 2o mg Pent.	1oo %	56 %
4	5o mg Azathioprin	1oo %	64 %
5	3o mg Azathioprin + 2o mg Pent.	1oo %	72 %
6	3o mg Azathioprin	1oo %	72 %

Tab. 2 zeigt die Anzahl der überlebenden Tiere in Prozent zur Ausgangszahl in Abhängigkeit von der Höhe der Azathioprin-Pentoxyl- bzw. Azathioprin-Dosis nach dem 9. Applikationstag.

2. Widerstandsfähigkeit der Tiere:
Will man die Widerstandsfähigkeit der Tiere gegen die Giftdosis mathematisch erfassen und setzt man daher

$w_{(t)} = e^{-R/A}$ ein, wobei $w_{(t)}$ die Wahrscheinlichkeit des Exitus nach 8 Applikationen, A = D die Höhe der Giftdosis und R als Maß für die Widerstandsfähigkeit angesehen werden kann,

so erhält man die in Tab. 3 angegebenen Werte.

Abschnitt	Serie	D = A	$W_{(t)}$	R
I	1 + 2	5o mg	12 %	1o6,o
II	1 + 2	7o mg	87 %	1o,o
	3 + 4	5o mg	35 %	52,5
	5 + 6	3o mg	12 %	6o,2

Bis zur 9. Applikation starben demnach bei 3o mg-Azathioprin-Dosierung 12 %, bei 5o mg 35 % und bei 7o mg 87 % der Tiere. Die angewandten Dosen sind im Vergleich zu den bei Menschen üblichen beachtlich hoch; beim Durchschnittsgewicht der Ratten von 2oo g handelt es sich um Dosen von 15o - 35o mg/kg, die in zweitägigem Abstand appliziert wurden. Beim Menschen ist die Dosierung mit 2-4 mg /kg rund hundertmal kleiner.

Auffällig ist die erheblich höhere Resistenz der Ratten (Hausstamm) im Versuchsabschnitt I gegen das Azathioprin im Verhältnis zu den SPF-Wistar-Ratten im Versuchsabschnitt II. Die Hausstammratten sind etwa doppelt so widerstandsfähig wie die letztgenannten (R = 1o6 : 52).

3. Pathophysiologie und Pathohistologie:

Ein Teil der Tiere starb in einer relativ frühen Phase (um den 5. Versuchstag) bei verminderten Leukozytenwerten, ein anderer zur gleichen Zeit oder etwas später bei stark erhöhten Werten. Bald nach Versuchsbeginn,

nach ca. 72 Stunden, stellten sich bei den Tieren die Symptome einer allgemeinen Adynamie ein, das Fell wurde glanzlos und struppig und es kam zu heftigen Diarrhoen. Im Respirationstrakt zeigte sich als Manifestation einer Azathioprin-Intoxikation eine sich rasch verstärkende Dyspnoe. Bei stichprobenartig vorgenommenen Sektionen und pathohistologischen Untersuchungen waren die Befunde immer gleichartig, unabhängig davon also, ob die Tiere mit Azathioprin allein oder der Azathioprin-Pentoxyl-Kombination behandelt waren. Es fanden sich beiderseitige Pleuraergüsse (ca. 2 - 5 ml) einer serösen, klaren Flüssigkeit und im Schnittpräparat über die ganze Lunge verstreute grau-gelbe Areale, z.T. disseminiert, z.T. confluierend. Makroskopisch konnte man sie als Einschmelzzonen deuten. Die Leber zeigte außer den Zeichen einer Blutstauung makroskopisch keine wesentlichen Veränderungen. Bei einigen Tieren konnte eine ähnliche Flüssigkeit wie aus der Pleura auch aus dem Bauchraum abpunktiert werden.

Bei der histologischen Untersuchung fanden wir in den Lungen ein eiweißreiches Oedem, kleine Gewebseinschmelzungen und im perivasculären und peribronchiolären Bindegewebe Ansammlungen von Rundzellen. Außerdem zeigten sich als Zeichen einer massiven katarrhalischen, eitrigen Bronchiolitis mit der Verstopfung der Lumina durch eitriges Exsudat.

In der Leber fanden sich Stauungsstraßen, hypoxämische Nekrobiosen der Läppchenzentren und azinozentrale Parenchymatrophien. Die Zellen der Läppchenperipherie zeigten keine auffallenden Veränderungen.

Der Tod der Tiere dürfte damit in der überwiegenden Zahl der Fälle durch pulmonale Veränderungen im Sinne einer Pneumonie mit Pleuritis exsudativa und sekundärem Rechtsherzversagen zu erklären sein. Für ein allergisches Geschehen und Tod durch Anaphylaxie, wie ihn CHALMERS (8) beschrieben hat, haben wir keinen Anhalt.

4. Das Verhalten der Leukozytenwerte:

Die Leukozytenwerte des einzelnen Versuchstieres zeigten bereits vor der Medikamentengabe erhebliche Schwankungen mit einer Strauung der Größenordnung $\pm$ 1000 Leukozyten/mm^3. Die mittleren Zahlen der Serien 2 und 4 führen zu einem Kurvenverlauf, der zu Beginn - allerdings nicht sehr deutlich - eine fallende, dann aber eine steigende Tendenz zeigt und nach Erreichen eines Maximums zum Ausgangswert zurückzustreben scheint. Bei diesen Serien starben relativ früh und sehr viele Tiere an den Folgen der Intoxikation. Bei der Serie 5, in der fast alle Tiere das Ende dieser Versuchsserie erlebten, ist der Verlauf ein anderer, indem hier nämlich die Leukozytenwerte bis zu einem Minimum am 6. Applikationstag abfallen und von da an sich bei steigender Tendenz zu normalisieren scheinen. Hier wird der Ausgangswert nie überschritten.

In den Serien 1 - 4 ist kein Unterschied zwischen den mit Azathioprin und den mit Azathioprin-Pentoxyl behandelten Tieren weder statistisch noch graphisch festzustellen. Dagegen besteht zwischen den Serien 5 und 6 eine, wenn auch nicht signifikante, Differenz, indem nämlich die zusätzlich mit Pentoxyl behandelten Tiere in ihren Leukozytenwerten während des gesamten Versuchsablaufs mehr oder weniger deutlich über den Werten der nur mit Azathioprin behandelten Tiere lagen.

Abbildung 3 und 4 deuten den charakteristischen Verlauf der Leukozytenwerte bei wiederholter Azathioprin- bzw. Azathioprin-Pentoxyl-Gabe an. Der vom 14. bis 18. Tag auftretende Leukozytensturz in der Serie 1 bis 4, insbesondere 2 und 4, ist bei einer Dosierung von 3o mg Azathioprin nicht mehr vorhanden. Im Gegenteil, hier scheinen sich die Leukozytenwerte bei steigender Tendenz zu normalisieren. Der Abfall bei hoher Dosierung muß wohl in Beziehung zur hohen Absterberate in diesen Serien gesehen werden.

Die dargestellten Kurven wurden durch Transformation der Leukozytenwerte in Logarithmen mit anschließender Mittelwertbildung und nachfolgender Delogarithmierung gewonnen.

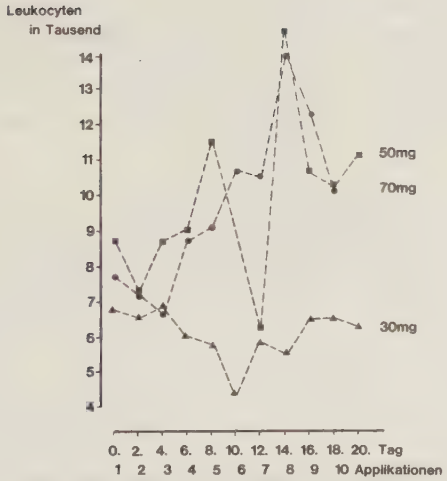


Abb. 3: Verhalten der mittleren Leukozytenwerte nach einer Azathioprin-Dosierung von 7o, 5o, 3o mg.

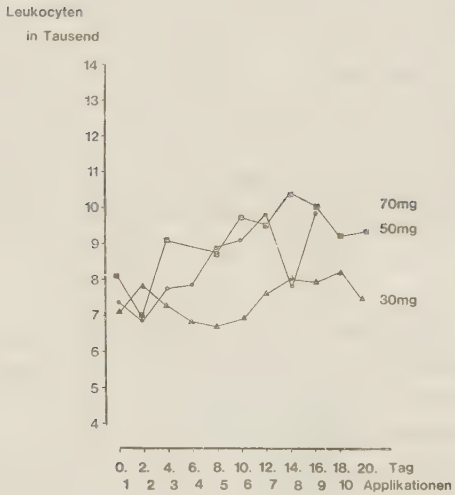


Abb. 4: Verhalten der mittleren Leukozytenwerte nach einer kombinierten Azathioprin-Pentoxyl-Dosierung von 7o, 5o, 3o mg Azathioprin + 2o mg Pentoxyl.

Faßt man die Mittelwerte der Serie mit hoher Azathioprin-Dosierung (25o - 35o mg/kg) zusammen und stellt sie denen mit niedriger Dosierung (15o mg/kg) gegenüber, so wird die Differenz im Verhalten der Leukozytenwerte deutlicher. Dies erfolgt in Abb. 5. Die dargestellte Kurve wurde ansonsten in gleicher Weise wie die in Abb. 3 und 4 gewonnen.

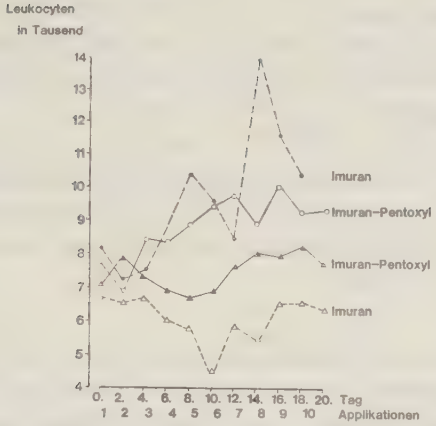


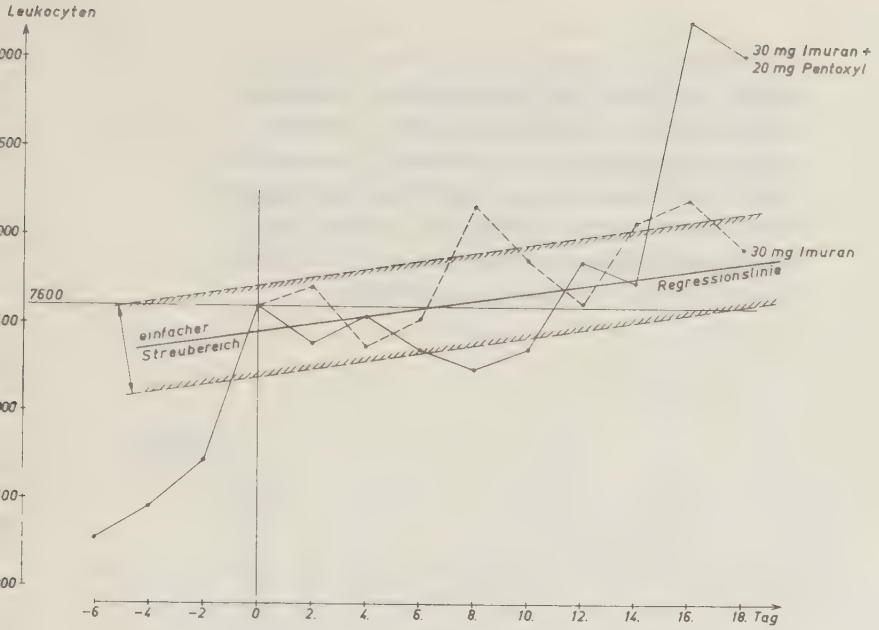
Abb. 5: Verlauf der Leukozytenmittelwerte der mit Azathioprin bzw. Azathioprin-Pentoxyl behandelten Tiere. Dabei sind die Mittelwerte der Serien 1 und 3 bzw. 2 und 4 zusammengefaßt und den Werten der Serie 5 bzw. 6 gegenübergestellt.

Unter den hohen Dosen von 7o mg und 5o mg Azathioprin starben relativ viele Tiere an den Folgen der Intoxikation, Resistenzminderung und nachfolgender pulmonaler Infektion. Deshalb war zu erwarten, daß am ehesten in jener Serie ein leukopoetischer Effekt

des Pentoxyls zum Ausdruck kommen würde, bei der die Mehrzahl der Tiere überlebten und somit die Ergebnisse nicht durch eine hohe Absterberate beeinflußt wurden. In dieser Ansicht wurden wir durch das Verhalten und den Verlauf der Leukozytenwerte, wie sie in Abb. 5 dargestellt sind, bestärkt.

Wir bearbeiteten daher die Ergebnisse der Serien 5 und 6 - nachdem sich mit den üblichen statistischen Verfahren kein Pentoxyl-Effekt nachweisen ließ - wie folgt:

Aus den Leukozytenwerten aller Tiere der Serien 5 und 6 wurden für den Tag Null (also vor der ersten Azathioprin- bzw. Pentoxyl-Gabe) der gemeinsame Mittelwert errechnet. Dieser in Abb. 6 über den Tag Null eingetragene Mittelwert (7600) diente als Ausgangswert für die Darstellung des Leukozytenkurvenverlaufs in beiden Versuchsserien. Die Kurvenpunkte entstanden, indem vom Meßwert am Tag Null ausgehend für die vorangegangenen und nachfolgenden Leukozytenzählungen Differenzen von Messung zu Messung gebildet wurden. Aus diesen entstanden nach Transformation in Logarithmen unter anschließender Beachtung der Vorzeichen Mittelwerte, die, delogarithmiert und ausgehend vom gemeinsamen Mittelwert am Tage Null, den Kurvenverlauf der Leukozyten für beide Versuchsserien ergaben. Für die Punkte Null bis Vierzehn wurde die Regressionslinie beider Serien und deren Streuung berechnet und in der Abb. 6 eingetragen.



Nur die Leukozytenwerte links vom Tag Null unter alleiniger Gabe von 2o mg Pentoxyl zeigen, ebenso wie die Meßpunkte unter Azathioprin-Pentoxyl-Dosierung am 16. und 18. Versuchstag einen statistisch signifikanten leukopoetischen Effekt des Pentoxyl. Im Versuch bis zum 15. Versuchstag konnte keine statistisch gesicherte Pentoxyl-Wirkung nachgewiesen werden.

Auch bei nachfolgender Bearbeitung der Ergebnisse war kein statistisch gesicherter Pentoxyl-Effekt nachweisbar.

Die Leukozytenwerte bei der letzten Bestimmung vor dem Tode der Tiere zeigten durch

ihre Häufigkeitsverteilung, ebenso wie die Kurven der über den betreffenden Meßtagen aufgetragenen prämortalen Leukozytenwerte, daß die mit Azathioprin-Pentoxyl behandelten Tiere im allgemeinen etwas höhere Leukozyten werte hatten. Doch hat dieser Befund eine Irrtumswahrscheinlichkeit von lo % (t-Test), ist also nicht statistisch gesichert.

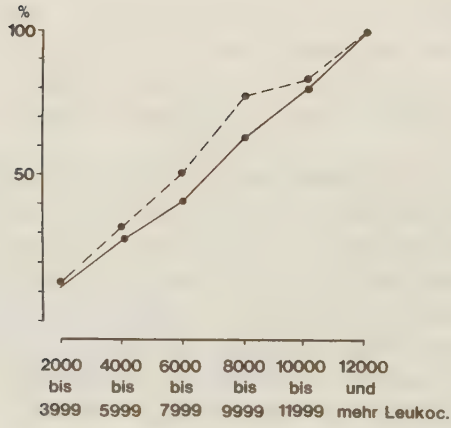


Abb. 7: Kumulative Häufigkeit der Leukozytenwerte verstorbener Ratten des zweiten Versuchsabschnitts (letzte Messung vor dem Tod).

(----- Azathioprin-behandelte Tiere
_____ Azathioprin-Pentoxyl-behandelte Tiere)

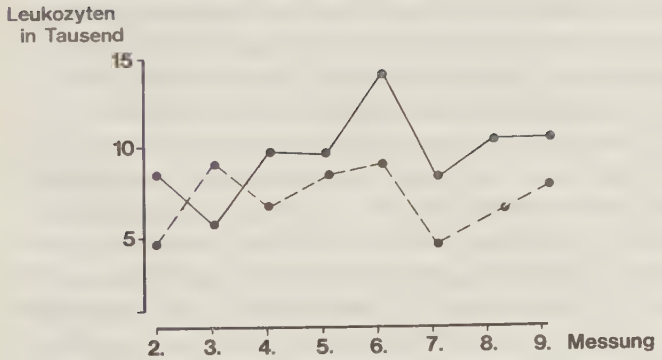


Abb. 8: Mittlere Leukozytenzahlen der verstorbenen Tiere (zweiter Versuchsabschnitt; letzte Messung vor dem Tod)

(----- Azathioprin-behandelte Tiere
_____ Azathioprin-Pentoxyl-behandelte Tiere)

Diskussion

Nach Vorversuchen an einem undefinierten Rattenhausstamm (Universität München), unbekannter Herkunft, unbekannten Geschlechts und Alters und einem mittleren Körpergewicht von 25o g, der zur Ermittlung der Dosishöhe der Substanzen diente und zur Testung, ob diese Spezies für unsere Versuchsbedingungen geeignet sei, wurden die Hauptversuche an insgesamt 2oo weiblichen SPF-Wistar-Ratten gleichen Alters und etwa gleichen Gewichtes durchgeführt. Dazu werden die Tiere in sechs Serien aufgeteilt und es wurden ihnen in zweitägigem Abstend 7o, 5o oder 3o mg Azathioprin teils mit, teils ohne 2o mg Pentoxyl oral appliziert. Anschliessend wurde das Verhalten der Leukozyten, die mittels einer Schwanzvenenpunktion und üblicher Auszählung in einer Zählkammer bestimmt wurden, beobachtet. Weibliche Ratten wurden gewählt, nachdem sich in eigenen Vorversuchen die individuellen Schwankungen in der Leukozytenzahl geringer als bei den männlichen Tieren gezeigt hatten. Tiere dieses Alters (3 - 5 Monate) eignen sich für derartige Untersuchungen, da nach HOFFMANN (2o) bereits ab Ende des 2. Lebensmonats annähernd konstante Durchschnittszahlen für die Gesamtleukozytenzahl zu erwarten sind.

I. Diskussion unserer Ergebnisse mit den Ergebnissen in der Literatur

In unseren Versuchen zeigte sich, daß weibliche SPF-Wistar-Ratten eine außerordentliche Toleranz-

breite gegenüber dem Azathioprin haben, gemessen an den in der Humanmedizin üblichen Dosen. Eine Panmyelophthise konnte mit einer Dosierung von 150 - 350 mg/kg, in zweitägigem Abstand gegeben, nicht erzielt werden, obgleich diese Dosierung nahe der LD_{50} liegt, die nach HUNSTEIN (21) bei Ratten 400 mg/kg beträgt. Noch bevor es zu einer peripheren Leukopenie kam, zeigten sich Intoxikationssymptome in Form von Resistenzminderung, Infektion und Erkrankungen des Mausergewebes. Diese Symptome traten frühestens nach 72 Stunden auf und führten, noch bevor es zu einer Granulopenie kam, zum Exitus der Tiere. Wir können hiermit die Aussagen von CLARKE (11) und MICHOT (33) bestätigen, die ebenfalls sahen, daß nicht die Leukopenie bzw. Granulocytopenie der erste Hinweis auf eine Azathioprin-Intoxikation ist.

Diese hohen Azathioprin-Dosen mußten gewählt werden, auch wenn die zwangsläufig folgende hohe Absterberate die Ergebnisse der Serien 1 - 4 beeinträchtigte, da nur Dosierungen nahe der LD_{50} bei Ratten - im Gegensatz zum Menschen - zu einer Knochenmarkschädigung führt (21).

Bei unseren Ergebnissen hat sich gezeigt, daß die Mortalität der Tiere eine charakteristische Abhängigkeit von der Höhe der applizierten Azathioprin-Gabe zeigte. In keiner Meßserie wurde die Lebensdauer der Ratten oder der Verlauf des Todes durch die hohen Dosen des Pentoxyl (100 mg/kg) beeinflußt. Damit stehen unsere Befunde im Gegensatz zu Veröffentlichungen von KORABLEV (25), der in Kaninchenversuchen nach Gabe einer myelotoxischen Substanz sah, daß deren Tod durch Pentoxyl-

Gabe (2o mg/kg und die) verhindert werden konnte. Auch russische Kliniker (5, 8, 26) schreiben dem Pentoxyl eine roborierende, stimulierende und lebensverlängernde Eigenschaft nach pharmakologischen (5), radiologischen (13) oder kryptogenen (26) Intoxikationen zu. Im russischen Sprachbereich äußern sich einzig und allein LISOVECKAJA (3o), WASSILJEV und SSAKSSONOW (45) kritisch über das Pentoxyl, und wir fanden unsere Ergebnisse mit den dort tierexperimentell und klinisch gefundenen Befunden übereinstimmend.

II. Argumente für das atypische Verhalten der peripheren Leukozyten

1. Gestörte Resorption durch gastrointestinale Erkrankung:

In unseren Untersuchungen, bei denen wir durch die Wirkung des Azathioprin eine Knochenmarksdepression erzielen wollten, die mit Hilfe des die Myelopoese stimulierenden Pentoxyl cupiert werden sollte, zeigte sich, daß selbst mit hoher Dosierung eine periphere Leukopenie nicht erzielbar war. Selbst nach 18 Versuchstagen war noch eine Hyperleukocytose zu finden, obgleich die Azathioprin-Wirkung bereits nach 2 - 4 Tagen einsetzen soll (Brit. Med. Journal 1966) und mindestens bis zum Entzug, meist aber länger anhalten soll. Die Ursache für diesen Widerspruch ist sicherlich darin zu suchen, daß sich bereits 72 Stunden nach Versuchsbeginn heftige Diarrhoen entwickelten als Hinweis auf die

Wirksamkeit der Substanz auf die Darmepithelien. Hierdurch wurde die Resorption des Pharmakon beeinflußt, so daß wohl eine erhebliche Diskrepanz zwischen der applizierten und resorbierten Menge bestanden hat und es fraglich erscheint, ob eine Blutkonzentration erreicht wurde, die nahe der LD_{50} lag und somit cyto- bzw. myelotoxisch wirken konnte. Der weitere progressive Verlauf der Intoxikation kann dann einmal durch weitere, geringe resorbierte Azathioprin-Mengen unterhalten worden sein, er kann aber auch allein durch die erste Applikation bedingt sein. Das Azathioprin, eingebaut in DNS bzw. RNS, kann noch lange nachwirken, nachdem es selbst oder seine Metabolite aus der Blutbahn verschwunden sind. Die relativ kleine Menge, welche zu 6-mercaptopurin-ribonucleotid umgewandelt war, kann seine toxische Wirkung in Form einer Proliferationshemmung oder Bildung von Nonsensproteinen noch lange Zeit später ausgeübt haben.

2. Bildung eines Alternativstoffwechsels:

Wir möchten annehmen, daß die intrazelluläre (Knochenmark) Medikamentenkonzentration nicht hoch genug war, um verschiedene "target enzymes" so wirksam zu hemmen, daß daraus eine Störung der Zellproliferation (Hämato- bzw. Leukopoese) resultierte. Ob die Wirkungslosigkeit des Azathioprin bei unseren Ratten durch Entwicklung einer Resistenz bedingt war, d.h., ob der Enzymblock durch einen Alternativstoffwechsel kompensiert wurde, können wir mit den

vorliegenden Untersuchungen nicht beweisen. Immerhin haben CHALMERS (1o und PATTERSON) bei Versuchen mit dem Mäuse-Sarkom-18o und an Mikroorganismen nachgewiesen, daß sich hier gegen das Azathioprin eine Resistenz durch Veränderung im Purinmetabolimus ausbilden kann. Nach CHALMERS (1o) besteht die Resistenz im Fehlen einer Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase, welche das 6-mercaptopurin in sensitiven Zellen in 6-thioinosin-5-phosphorsäure umwandelt.

3. Frühzeitige Mortalität der Versuchstiere:

Die scheinbare Wirkungslosigkeit des Azathioprin in unseren Versuchen kann aber auch seinen Grund in der hohen und vor allem frühzeitigen Absterberate unserer Ratten haben. Nach MICHOT (33) und KÖLLE (24) wird im ersten Stadium der Azathioprin-Wirkung allein das erythropoetische System betroffen, und die Granulopoese ist zu diesem Zeitpunkt, zumindest morphologisch, nicht beeinflußt. In diesem Stadium kann es dann zu einer peripheren Hyperleukocytose, wie wir sie und auch HUNSTEIN (21) gesehen haben, kommen. Erst bei weiterem Einwirken der Substanz kommt es zu Reifungsstörungen in der Granulopoese mit Übergang ins dritte Stadium, der Panmyelophthise. Dieses Stadium wurde von unseren Tieren infolge bronchopulmonaler und cardialer Komplikationen nicht mehr erreicht.

Einen Hinweis, daß die die Hyperleukocytose bedingende Markhyperplasie Vorstadium einer Leukose darstellt, haben wir im peripherem Blutbild nicht gewinnen können. Außer einer Linksverschiebung fand sich im Differentialblutbild kein Hinweis dafür.

4. Das Verhalten der Leukozytenwerte in Serie 5 und 6:

Etwas anders verhielten sich die Leukozytenwerte der Serien 5 und 6, in denen Azathioprin nur mit 3o mg/kg dosiert wurde. Hier entwickelte sich zunächst eine Leukopenie, die am Ende der ersten Versuchswoche ihr Minimum erreichte. Trotz weiterer Azathioprin-Gaben kehrten die Leukozytenwerte dann kontinuierlich zum Ausgangswert zurück. Bei den Tieren, die zusätzlich und prophylaktisch mit Pentoxyl behandelt waren, war dieser Leukozytenabfall nicht zu beobachten. Im Gegenteil, hier lagen die Werte während der gesamten Versuchsdauer über dem Ausgangswert. Optisch deutlich, ließen sich diese Befunde statistisch nicht sichern.

Nach unseren Versuchen ist Pentoxyl nicht in der Lage, die Morbidität der Versuchstiere oder die Mortalität mit Azathioprin-behandelter Ratten zu verhindern. Die ihm von anderen Autoren zugeschriebenen reborierenden, lebensverlängernden Eigenschaften nach Intoxikation konnten wir ebensowenig feststellen wie den Befund, daß

Pentoxyl unter bestimmten Umständen die Mortalität von Ratten steigere (45). Weder statistisch noch klinisch oder im pathohistologischen Bild zeigte sich eine Differenz zwischen der mit Pentoxyl behandelten Gruppe und der Kontrollgruppe. Der Verlauf war einzig und allein von der Höhe der Azathioprin-Dosierung abhängig.

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird die Wirksamkeit eines Pharmakon (Azathioprin) und eines Antidot (Pentoxyl) auf das hämato- und leukopoetische System geprüft. Dabei wurde als Parameter für die Effektivität das periphere Blutbild gewählt.

Die Untersuchung erfolgte an SPF-Wistar-Ratten, denen das Pharmakon und das Antidot gleichzeitig oral appliziert wurde.

In den Ergebnissen zeigte sich, daß bei Ratten mit oraler Applikation des Azathioprin keine Medikamentenkonzentration erreicht werden konnte, die zu einer Hemmung der myeloischen bzw. lymphatischen Zellproliferation hätte führen können,da das Mausergewebe rascher und empfindlicher auf die Intoxikation reagierte und die Tiere dadurch an den Folgen einer sekundären Infektion ad exitum kamen.

Die gleichzeitige Gabe eines Antidot beeinflußte den Verlauf der Erkrankung ebensowenig wie die Hämato- bzw. Leukopoese. Die dem Pentoxyl in der russischen Literatur zugeschriebenen positiven Eigenschaften bei pharmakologischen, radiologischen oder essentiellen Erkrankungen des myelopoetischen Systems fanden wir nicht bestätigt.

Auch morphologisch, d.h. im pathohistologischen Bild, fanden wir keinen Hinweis auf eine Wirksamkeit dieser Substanz.

Die Ergebnisse demonstrieren, daß das Pentoxyl kein wirksames Pharmakon ist, welches eine in der Transplantationschirurgie oder bei Immunopathien induzierte Azathioprin-Intoxikation verhindern oder beeinflussen kann.

L i t e r a t u r

1) ALDANAZAROV und SABDENOVA:
Experiment of treating with folic acid and Pentoxyl patients suffering from lead poisoning.
Transactions of the institute of Territorial Pathology. Academy of Sciences of the Kazakh (SSR) 4: 12o-127 (1956).

2) ALEXANDER, J.W., HEGG, M.E., McCoy, V.H., and ALTEMEIER, W.A.:
Neutrophil function and infection during immunsuppression and transplantation.
Surgical Forum.

3) BANDMANN, A.:
Administration of Pentoxyl in the Surgical Clinic. Theses and Author's Reports to to Scientific Conference on the Problem of Regulating Inflammatory and Regenerative Progresses.
Leningrad, 1959, pp 5-6.

4) BEGEMANN, H.:
Praktische Hämatologie.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1969,
4. Auglage.

5) BEIER, V., and BUTOMO, N.:
Administration of Pentoxyl.
Clinical Medicine 31/8: 9-12 (1953).

6) BRIDGER, W.A., COHEN, L.H.:
The mechanism of inhibition of actenyl-succinate lyase by 6-mercaptopurine nucleotide (thioinosinate).
Biochem. biophys. Acta 73: 514-516 (1963).

7) BRINKMANN, W.H.:
Die Nierentransplantation in Experiment und Klinik.
Medizinische Welt 15: 917-923 (1968).

8) BUTOMO, N.:
Administration of certain stimulators of hemopoiesis in leukopenia developing as a result of the effekt of ionising radiations on the organism. MAterials of the Scientific Conference on the Problem of "Radiation Sickness".
Leningrad 1957, 171-173.

9) CHALMERS, A.H., KNIGHT, P.R., and ATKINSON, M.R.:
Conversion of Azathioprine into mercaptopurine and Mercaptoimidazole derivates in vitro and during immunsuppressive therapy.
Aus. J. exp. Biol. med. Sci. 45: 681-691 (1967).

1o) CHALMERS, A.H., KNIGHT, P.R., and ATKINSON, M.R.:
6-Thiopurines as substrates and inhibitors of purine oxydases a pathway for conversion of azathioprine into 6-thiouric acid without release of 6-mercaptopurine.
Aust.J.exp.Biol.med. Sci. 47: 263-273 (1969).

11) CLARKE, D!A., PHILIPS, F.S., STERNBERG, S.S., STOCK, C.Ch., ELION, G.B., HITCHINGS, G.H.:
6-Mercaptopurine: Effekts in Mouse Sarcoma 18o and in Normal Animals.
Cancer Research 13: 592-6o4 (1953).

12) Documenta Geigy:
Wissenschaftliche TABELLEN;
J.R. Geigy AG., Pharma, Basel, 7. Auflage.

13) DOMSHLAK, B., and KOZNOVA, L.:
Administration of Pentoxyl in radation leukopenia in man.
Medical Radiology 3/4: 29-33 (1958).

14) DUME, Th. und PÖTTGEN, W.:
Isolierte Schädigung der Erythropoese unter immunsuppressiver Therapie nach Nierentransplantation.
Dtsch. Med. WWschr. 17: 948-949 (197o).

15) ELION, G.B., CALLAHAN, S.W., HITCHINGS, G.H., RUNDLES, R.W., and LASZLO, J.:
Experimental clinical, and metabolic studies of thiopurines.
Chancer Chemotherapie Reports, No. 16, 1962.

16) ELION, G.B., HITCHINGS, G.H., and VANDERWERFF, E.:
Antagonists of nucleic acid derivates.
J. biol. Chem. 192: 505-518 (1951).

17) ELION, G.B.:
Biochemistry and pharmacology of purine analogues.
Federation Proceedings. Vol 26, 898-903 (1967).

18) HEINE, K.M., KLATT, R., STOBBE, H., APOSTOLOFF, E. und JENDRUCH, Ch.:
Lymphocytentransformation unter immunsuppressiver Therapie beim Lupus erythematodes visceralis.
Berl.Ges.Inn.Med. 6: 152-154 (1968).

19) HITCHINGS, G.H., and ELION, G.B.:
Chemical suppression of the immune response.
Reprintes from Pharmacological Reviews. Vol 15, No. 2, June 1963. Copyright (C) 1963 by the WILLIAMS & WILKINS Co., Printed in USA.

20) HOFFMANN, H. und Kersten, L.:
Biologische Normalwerte bei Wistar-Ratten (Jena) verschiedenen Alters.
Zschr.Versuchstierk. 8: 227-235 (1966).

21) HUNSTEIN, W., PERINGS, E. und KLOSE, E.:
Tierexperimentelle Langzeitversuche mit Azathioprine (IMURAN) zur Prüfung seiner myelotoxischen Wirkung.
Dtsch.med. Wschr. 92: 1164 ff. (1967).

22) HUNSTEIN, W. und HORT, W.:
Zum Krankheitsbild der vernarbenden Knochenmarksentzündung (interstitielle Myelitis "Rohr" mit Myelofibrose).
Schweiz.med.Wschr. 96: 1223-1225 (1966).

23) KOCH, W.:
Die Doktorarbeit.
Max Hueber Verlag, München 1966, 4. Auflage.

24) KÖLLE, G.:
Knochenmarksschädigung bei immunsuppressiver Therapie der juvenilen rheumatoiden Arthritis und des Still-Syndroms mit Azathioprine.
Dtsch.Med.Wschr. 44: 2268-2273 (1969).

25) KORABLEV, M.V.:
Effect of Pentoxyl in leukopenia produced with tetrathion (tetramethyl-thiuram-sulfide).
Farmakol.toksikol. 27: 199-2o4 (1964), (Moskva).

26) LAZAREV, N., and FELISTOVICH, G.:
Therapeutic administration of Pentoxyl in aleukias.
Medgiz, Leningrad 1954. Publishing House Leningrad 1953.

27) LEMMEL, E.M., MOTYEKA, K., SOUCEK, J., NOUZA, K.:
Der Einfluß von Lebensalter und experimentell induzierter Krankheit auf die Verträglichkeit cytostatisch wirksamer Stoffe auf Mäuse.
(Cesholav.Akad.Ved.Prague)
Arzneim.-Forsch. 17 (2) 142-145 (1967).

28) LETTERER, E.:
Grundsätzliche Möglichkeiten zellulärer und geweblicher Reaktionen bei Allergie.
Dtsch.Med.Wschr. 9: 442-447 (1969).

29) LIFSHITS, R.I.:
Effects of Pentoxyl on rabbit serum proteins.
Aktual'n.Vorp.Eksperim.Med. Biol., Tr. Chelyab.Otd.Vses.Fiziol.Obskchestva, Chelyabinsk.Sb. 1962 (1), 15o-153, Referat in Chem. Abstrac 6o: 4654 ff. (1964).

3o) LISSVECKAJA, I.V.:
Der Einfluß von Pentxyl auf das weiße Blutbild. Effect of Pentoxyl on the leukocyte Composition of the Blood in Leukopenias.
Vrachebnoe Delo, 1956, pp. 9o5-91o.

31) MATHÉ, G.:
Réduction par L'AZATHIOPRINE de l'inhibition de la greede de moelle osseuse allogénique pa des transfusions sanguines antérieures.
Rev.Franc.Etud.Clin.Biol. 11: 1o26-1o27 (1966).

32) McQUARRIE, D.G., SARGEANT, J.R., and VARCO, L.R.:
The effect of nomograft antigen strength on the emergence of 6-Mercaptopurine-resistent, Immune Competent Cells.
J. of surgical research 5: 79-89 (1965).

33) MICHOT, F.:
Erfahrungen in der Langzeitbehandlung von Kollagenkrankheiten mit Azathioprin (Imuran®).

34) MINKINA, N.:
Histological Changes in Some Organs of rats after administration of Pentoxyl. (Effect of Pentoxyl on nucleic metabolism).
Pharmacology and Toxicology, Vol 21, No. 6, 1958, pp. 69-74.

35) MOROZOVA, E.N.:
The effect of Pentocyl on the bone marrow lipides in leukopenia.
Byull.Eksptl.Biol.i.Med. 9/2: 54 (1961).
Referat in Chem. Abstr. 55: 22601 (1961).

36) PICHLMAYR, H., JABOUR, A., FAUL, P.:
Nierentransplantation.
Arch.f.klin.Med. 214: 306-335 (1968).

37) PICHLMAYR, H.:
Die Beeinflussung der cellulären Immunreaktion gegenüber Homotransplantaten.
Sonderdruck aus Verhandlungsbericht der "Deutschen Gesellschaft für Urologie", 21. Tagung 1965 in Düsseldorf.
Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1966.

38) PICHLMAYR, H. und JUNGINGER, Th.:
Vergleichende Untersuchungen über lymphozytensenkende Maßnahmen.
Z.f.d.ges.experiment.Med. einschl. experiment.Chirurg. 3: 143 (1967).

39) RUNDLES,R.W., LASZLO, J., ITOGA, J.B., and GARRISON, F.E.:
Clinical and hematologic stuy of 6-purine (B.W. 57-322) and related compounds.
Cancer Chemother.reports. 4: 99-115 (1961).

4o) SCHEIFFARTH, F. und WARNATZ, H.:
Langzeitbehandlung von Immunpathien unter besonderer Berücksichtigung immunsuppressiver Medikamente.
Dtsch.Med. Wschr. 47: 3444-3449 (1969).

41) SCHEUFLER, H.:
Über den Einfluß des Ortes und der Art der Blutentnahme auf das Blutbild der Hausmaus.
Zschr.Versuchstierk. 9: 152-157 (1967).

42) SCHARTZ, R., DAMESHEK, W.:
The effect of 6-mercaptopurine on homograft reactions.
J.Clin.Investigation 39: 952-957 (196o).

43) TRESKE:
Diagnostik der Osteomyelosklerose und Osteomyelofibrose.
Dtsch. Med.Wschr. 33: 1689-169o (197o)

44) WALLIS, W.A. and ROBERTS, V.H.:
Statistics, a new approach.
Copyright 196o by "The Free Press", Glencoe, Illinois.

45) WASSILJEW, P.W. und SSAKSSONOW, P.P.:
Besonderheiten der Reaktion von Tieren auf Heilmittel bei Strahlenkrankheit.
Pharmakol.u.Toxikol. 21/3: 3o-33 (1958).
Referat in Chem.Zbl., S. 12o1 (1959).

46) WEIHE, W.H.:
Kleinklima, Klima und Wetter in der Versuchstierhaltung.
Zschr.Versuchstierk. 7: 116-127 (1965).

47) ZENKER, R., PICHLMAYR, H. et al.:
Erste Erfahrungen mit der Transplantation von Leichennieren beim Menschen.
Münch.Med.Wschr. 12: 613-62o (1967).

A n h a n g

Anzahl der in der Serie 1 - 6 des Abschnitts 11 überlebenden Tiere. (Absolute Zahlen und Prozentzahlen, wie sie in Abb. 1 graphisch dargestellt sind).

Abschnitt 11:

Serie 1	5o	5o	28	23	2o	15	9	3	o		Tiere
	1oo	1oo	56	46	4o	3o	18	6	o		%
Serie 2	5o	5o	44	16	15	11	7	6	3		Tiere
	1oo	1oo	88	32	3o	22	14	12	6		%
Serie 3	25	25	25	24	22	17	16	15	14	11	Tiere
	1oo	1oo	1oo	96	88	68	64	6o	56	44	%
Serie 4	25	24	24	2o	19	18	18	17	16	12	Tiere
	1oo	96	96	8o	76	72	72	68	64	48	%
Serie 5	25	25	25	25	25	24	23	22	18	17	Tiere
	1oo	1oo	1oo	1oo	1oo	96	92	88	72	68	%
Serie 6	25	25	25	25	25	23	21	2o	18	18	Tiere
	1oo	1oo	1oo	1oo	1oo	92	84	8o	72	72	%

Leukozytenwerte zu den Abb. 3 und 4 sowie 5. Die Leukozytenwerte wurden durch Transformation der einzelnen Werte in Logarithmen mit anschließender Mittelwertsbestimmung und nachfolgender Delogarithmierung gewonnen.

Applikationen	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Abschnitt II											
Serie 1	7400	6852	7754	7868	8910	9135	9829	7551	9980	--	--
Serie 2	7715	7218	6640	8704	9132	10710	10540	14040	12310	10149	--
Serie 3	8186	6920	9195	8907	8862	9797	9574	10430	10190	9289	9360
Serie 4	8762	7325	8706	9074	11570	8889	6063	15660	10610	10212	1187
Serie 5	7157	7954	7364	6990	6760	6930	7610	8056	7914	8298	7411
Serie 6	6862	6663	6872	6035	5884	4453	5929	5601	6648	6680	6496
Serie 1-3	7793	6886	8475	8383	8886	9466	9702	8990	10685	9289	9366
Serie 2-4	8239	7271	7673	8889	10351	9799	8301	14850	11460	10180	--

Mittlere Leukozytenzahlen der verstorbenen Tiere; letzte Messung vor dem Tod.

Messung	2	3	4	5	6	7	8	9
Abschnitt II								
Serie 1	84o2	5625	985o	1496o	13o5o	8633	1o116	---
Serie 3	---	685o	116oo	1o27o	1535o	1o8oo	1o75o	1o65o
Serie 5	---	---	---	43oo	485o	1145o	1o15o	119oo
	84o2	6238	1o775	9843	11o83	1o295	1o411	11278
Serie 2	5633	842o	325o	12188	11369	84oo	82oo	---
Serie 4	---	9763	9o5o	63oo	---	33oo	95oo	8713
Serie 6	---	---	---	45oo	66oo	275o	425o	---
	5633	9o93	615o	7663	8985	4816	7783	8713

Herrn Prof. Dr. med. R. Zenker danke ich für die Möglichkeit, diese Versuche an seiner Klinik durchzuführen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. H. Pichlmayr für die Überlassung des Themas und freundliche Beratung.

Lebenslauf

Am 3. März 1939 wurde ich, Uwe Helms, als Sohn des Offiziers Harald Helms und seiner Ehefrau Käthe, geb. Frank, in Berlin geboren.

Bis 1944 lebte ich in Berlin. Von dort zogen wir nach der Ausbombung nach Herford in Westfalen, wo ich die Volksschule und anschließend das altsprachliche Friedrichs-Gymnasium besuchte. 1962 legte ich an dieser Schule die Reifeprüfung ab.

Im Sommersemester 1962 begann ich mit dem Medizinstudium an der Universität Mainz, bestand dort nach zwei Semestern das Vorphysikum und im März 1965 das Physikum. Das klinische Studium absolvierte ich an der Medizinischen Akademie in Lübeck (Sommersemester 1965), in Basel (Wintersemester 1965/66), in Gießen (Sommersemester 1966) und an der Universität München (ab Wintersemester 1966/67), an der ich am 8. August 1968 die ärztliche Prüfung bestand.

Nach der Medizinalassistentenzeit begann ich am 1. Januar 1970 meine Facharztausbildung in der Abteilung für Anaesthesiologie der Medizinischen Hochschule Hannover bei Prof. Dr. E. Kirchner, wo ich z.Zt. noch ausgebildet werde.